

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-184366

(43)公開日 平成5年(1993)7月27日

(51)Int.Cl.³

C12N 15/00

識別記号

庁内整理番号

A 8931-4B

FI

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数8(全27頁)

(21)出願番号

特願平4-24658

(22)出願日

平成4年(1992)1月14日

(71)出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 谷野 信剛

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 久留主 泰朗

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74)代理人 弁理士 小田島 平吉 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA及びその利用

(57)【要約】

【構成】 プレバクテリウム・フラバムMJ-233

からアスパルトキナーゼをコードするDNAを単離し、
この遺伝子の塩基配列を決定した。

【効果】 このアスパルトキナーゼをコードする遺伝子
DNAを導入したコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラ
スミドで形質転換されたプレバクテリウム・フラバム
MJ-233株は、L-リジンの生成量が増加した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌由来のアスパルトキナーゼ
(E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項2】 コリネ型細菌がブレヴィバクテリウム・フ

ラバム (Brevibacterium flavum) MJ 233である請
求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 次のDNA塩基配列

【化1】

```
GTGGCCCTGG TCGTACAGAA ATATGGCGGT TCCTCGCTTG AGAGTCCGGA ACGCATTAGA 60
AACGTCGCTG AACGGATCGT TGCCACCAAG AAGGCTGGAA ATAATGTCGT GGTGTCTGCT 120
TCCGCAATGG GAGACACCAC GGATGAGCTT CTAGAACTTG CTCCGGCAGT GAATCCCGTT 180
CCGCCAGCTC GTGAAATGGA TATGCTCCTG ACTGCTGGTG AGCGTATTTC TAACGCTCTC 240
GTGCCCATTG CTATTGAGTC CCTGGGTGCA GAGGCTCAAT CTTTCACGGG TTCTCAGGCT 300
GGTGTGCTCA CCACCGAGCG TCACGGAAAC GCAAGCATTG TTGATGTCAC TCCAGGTCGT 360
GTGCGTGAAG CACTCGATGA GGGCAAGATC TGCATTGTTG CTGGTTTCCA GGGTGTCAAT 420
AAGGAAACCC GCGATGTCAC CACGTTGGGT CGCGCTGGTT CTGATAOCAC TGCAGTTGCA 480
TTGGCAGCTG CTCTGAACGC TGATGTGTGT GAGATTTACT CAGATGTTGA CGGCGTGTAC 540
ACCGCTGACC CGCGCATCGT TCCTAATGCT CAGAAGCTGG AAAAGCTCAG CTTCGAAGAA 600
ATGCTGGAAC TTGCTGCTGT TGGCTOCAAG ATTTTGGTGC TACGCAGTGT TGAATAOGCT 660
CGTGCAATTCA ATGTGCCACT TCGCGTACGC TCGTCTTATA GCAATGATCC CGGCACTTTG 720
ATTGCCGGCT CTATGGAGGA TATTOCTGTG GAAGAAGCAG TCCTTACCGG TGTCGCAACC 780
GACAAGTCCG AAGCCAAAGT AACCGTTCTG GGTATTTCCG ATAAGCCAGG CGAGGCTGCG 840
AAGGTTTTCC GTGCGTTGGC TGATGCAGAA ATCAACATTG ACATGGTTCT GCAGAACGTC 900
TCCTCTGTGG AAGACGGCAC CACCGACATC ACGTTCACCT GCCCTCGCTC TGACGGACGC 960
CGTGCGATGG AGATCTTGAA GAAGCTTCAG GTTCAGGGCA ACTGGACCAA TGTGCTTTAC 1020
GACGACCAGG TCGGCAAAGT CTCCCTCGTG GGTGCGGGCA TGAAGTCTCA CCCAGGTGTT 1080
ACCGCAGAGT TCATGGAAGC TCTGCGCGAT GTCAACGTGA ACATCGAATT GATTTCACCC 1140
TCTGAGATCC GCATTICCGT GCTGATCCGT GAAGATGATC TGGATGCTGC TGCACGTGCA 1200
CTGCATGAGC AGTTCCAGCT GGGCGGGCGAA GACGAAGCCG TCGTTTATGC AGGCACCGGA 1260
CGC 1263
```

で示されるアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.)
をコードする遺伝子DNA。

【請求項4】 次のアミノ酸配列

【化2】で示されるアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7.
2. 4.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子
DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子
DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子

を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換えプラスミドで形質
転換されたコリネ型細菌。

【請求項8】 グルコースを、請求項7記載のコリネ型
細菌の培養菌体又は菌体処理物と接触させてL-リジンを
生成せしめることを特徴とするL-リジンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アスパルトキナーゼ

(E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子を含むコリネ型細菌由来の遺伝子DNA、該遺伝子DNAを含む組換えプラスミド、該プラスミドで形質転換されたコリネ型細菌、及び該コリネ型細菌を用いるL-リジンの製造法に関する。

【0002】L-リジンは、必須アミノ酸として蛋白質中にその存在が知られ、医薬や食品添加物として用いられている。

【0003】

【従来の技術】従来、L-リジンの工業的製造法としては、グルタミン生産菌であるコリネ型細菌の各種栄養要求株、各種薬剤耐性株、各種薬剤感受性株を用いてL-リジンを製造する方法が知られている【例えば、特公昭51-21078号公報、特公昭53-1833号公報、特公昭62-8692号公報等参照】。また、組換え菌を用いた製造法も提案されている【特開昭56-160997号公報、特開昭60-62994号公報、特開昭62-79788号公報等参照】。しかしながら、従来提案されている方法によるL-リジンの製造法では、対糖収率が低く及び／又はL-リジンの蓄積に限界があり、新たな観点から、遺伝子工学的手法による菌株の改良等を含め、L-リジンをより効率的に生成させる方法の提供が強く求められている。

【0004】一方、アスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 由来の遺伝子 [Journal of Biological Chemistry, 256, p 10228~p 10230, 1981参照] がよく研究されている。また、グラム陽性細菌由来のアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) としては、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 等が知られている [Journal of Biological Chemistry, 262, p 8787~p 8798, 1987; Molecular Microbiology, 5, p 1197~p 1204, 1991参照]。しかしながら、ブレヴィバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) 由来のアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子については従来の報告例は見当らない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、コリネ型細菌由来のアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて、新たな観点から効率的にL-リジンを製造することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、コリネ型細菌染色体よりアスパルトキナーゼ遺伝子を単離し、該遺伝子を適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を

形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いると、効率的にL-リジンを製造しうることを見出し本発明を完成するに至った。

【0007】かくして本発明によれば、

- (1) コリネ型細菌由来のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA;
 - (2) 該遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド;
 - (3) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌; 及び
 - (4) 該形質転換されたコリネ型細菌を用い、グルコースを原料としてL-リジンを製造する方法
- が提供される。

【0008】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

【0009】本発明の「アスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA」とは、L-アスパラギン酸にリン酸を付加する酵素、すなわちアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子DNAを意味するものである。

【0010】アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (以下、これを「A断片」と略称することがある) は、その塩基配列が決定された後においては合成することも可能であるが、通常はアスパルトキナーゼ生産性微生物からクローニングされる場合が多く、その供給源となる微生物としては、コリネ型細菌、殊にブレヴィバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ233 (FERM BP-1497) およびその由来株が有利に使用される。

【0011】これらの供給源微生物からA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである: A断片は、上記コリネ型細菌、例えばブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0012】まず、ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばEcoRIを用いて染色体DNAを完全に分解する。

【0013】得られるDNA断片をクローニングベクター、例えばpHSG399 (宝酒造製) に挿入し、このベクターを用いて、アスパルトキナーゼ遺伝子が欠損した大腸菌 (エシェリヒア・コリ) 変異株CGSC5074 [エシェリヒア・コリ ジエネテック・ストック センター (*Escherichia coli* Genetic Stock Center)、デパートメントオブバイオロジー、ユールユニバーシティ (Department of Biology, Yale University); P.O. Box 6666 New Haven, CT 06511-744, U.S.A. 保存菌株] を形質転換し、選択培地に塗抹すること

により、形質転換株を取得する。

【0014】得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。

【0015】かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを、通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法等による形質転換により、前記アスパルトキナーゼが欠損した大腸菌変異株に導入し、選択培地に塗抹する。

【0016】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたブ

レビバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。

【0017】このようにして得られるA断片の一つは、上記ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素EcoRIの完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素NruIで切断することによって得られる大きさが約1.7kbのDNA断片を挙げることができる。

【0018】この約1.7kbのアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に示す。

【0019】

【表1】

表1

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
Dra I	1	0.2、1.5
Hinc II	2	0.3、0.6、0.7
Hind III	1	0.4、1.2

なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0020】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ (λ phage) のDNAを制限酵素Hind IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ (ϕ x 174 phage) のDNAを制限酵素Hae IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1kbから1kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0021】一方、上記のブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素NruI-EcoRIによって切断することにより得られる大きさが

約1.7kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119 (宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxyc hain termination 法、Sanger, F.et.al., Proc.Natl.A cad.Sci.USA, 74, p5463, 1977) により決定することができる。このようにして決定した上記約1.7kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したアスパルトキナーゼをコードする遺伝子は、以下に示す配列を有するものであり、421個のアミノ酸をコードする1263の塩基対から構成されている。

【0022】

【化3】上記の塩基配列を包含する本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製 System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0023】また、前記の如くブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、アスパルトキナーゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0024】以上に詳述した大きさが約1.7kbのDNA断片の制限酵素による切断点地図を図1に示す。

【0025】本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）は、適当なプラスミド、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でアスパルトキナーゼの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0026】また、本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターはコリネ型細菌が保有する該遺伝子自身のプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、アスパルトキナーゼ遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であればいかなるプロモーターであってもよい。

【0027】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0028】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0029】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、ブレヴィバクテリウム・スタチオニス（*Brevibacterium stationis*）IFO12144（FERM BP-2515）からプラスミドpBY503（このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照）DNAを抽出し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出

す。これらの両断片をプラスミドpHSG298（宝酒造製）のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0030】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えばプラスミドベクター中に1箇所だけ存在する制限酵素部位を、該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0031】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。

【0032】このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約1.7kbのA断片を導入した組換えプラスミドは、L-リジンの製造に好適に用いることができる組換えプラスミドの一つであり、本発明者らはこれをプラスミドpCRY30-AKと命名した。プラスミドpCRY30-AKの作成方法の詳細については、後記実施例4で説明する。

【0033】このようにして造成されるアスパルトキナーゼ遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入して該微生物の培養物を用いてL-リジンを安定に効率よく生産することが可能となる。

【0034】本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233（FERM BP-1497）、ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41（FERM BP-1498）、ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11（FERM BP-1500）、ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21（FERM BP-1499）等が挙げられる。

【0035】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- α -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール資化性微生物である（特公昭59-28398号公報第3～4欄参照）。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- α -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である（特開昭62-51998号公報参照）。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERM BP-1497の菌株を親株としたD- α -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である（特開昭61-177993号公報参照）。

【0036】これらの微生物の他に、プレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC 6871、同ATCC 13745、同ATCC 13746；プレビバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC 14020；プレビバクテリウム・ラクトファーメントム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869；コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0037】なお、宿主としてプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502（特開昭63-36787号公報参照）のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である [Bact. Rev. 36 p. 361~405 (1972) 参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0038】宿主プレビバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ（濃度：0.2~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）もしくはエチジウムブロミド（濃度：0.2~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）等を含む培地に、1ml当たり約10細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0039】このようにして得られるプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビニア・カロトボラについて知られているように [Calvin, N.M. and Hanawalt, P.C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988) ; Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988) 参照]、DNA受容菌へのパルス波通電 [Sato, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159 (1990) 参照] によりプラスミドを導入することが可能である。

【0040】上記の方法で形質転換して得られるアスパルターゼ産生能を有するコリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来株の培養方法を以下に述べる。

【0041】培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通

常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、蔗糖等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0042】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約20~約40℃、好ましくは約25℃~約35℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5~10、好ましくは7~8付近とすることができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。

【0043】培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1~5容量%、更に好ましくは2~3容量%である。また、培養期間は通常1~7日間とすることができ、最速期間は3日間である。

【0044】このようにして得られる培養物から各々菌体を集めて、水又は適当な緩衝液で洗浄し、L-リジン生成反応に使用することができる。

【0045】L-リジン生成反応においては、これらの菌体をそのまま用いることができ、あるいは超音波処理等を加えた菌体破砕物、さらにそれから分離回収した粗酵素又は精製酵素として、あるいはそれらを適当な担体に固定化して用いることができる。以上に述べた如き菌体の破砕物や粗または精製酵素、固定化物等を本明細書ではまとめて「菌体処理物」という。

【0046】しかして本発明に従えば、グルコースを、上記培養菌体又は菌体処理物と接触させて、L-リジンを生成せしめることからなるL-リジンの製造法が提供される。

【0047】グルコースと上記培養菌体又は菌体処理物との接触は、通常の酵素反応と同様に、水性媒体中において、好ましくは約20~約40℃、特に約25~約35℃において行なうことができる。

【0048】生成するL-リジンは例えば、高速液体クロマトグラフィー等の手段により反応液から分離回収することができる。

【0049】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

【0050】実施例1

プレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）のクローン化

（A）プレビバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地〔組成：尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g、 K_2HPO_4 0.5g、 KH_2PO_4 0.5g、 MgSO_4 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン $200\mu\text{g}$ 、塩酸チアミン $200\mu\text{g}$ 、グルコース20g、蒸留水1l〕1lに、プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を $10\text{mg}/\text{ml}$ の濃度にリゾチームを含む 10mM NaCl - 20mM トリス緩衝液 (pH8.0) - 1mM EDTA - 2Na 溶液 15ml に懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が $100\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、 37°C で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、 50°C で6時間保温して容菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 ($5,000\times g$ 、20分間、 $10\sim 12^\circ\text{C}$) し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに 10mM トリス緩衝液 (pH7.5) - 1mM EDTA - 2Na 溶液 5ml を加え、 4°C で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0051】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA溶液の $90\mu\text{l}$ を制限酵素EcoRI 50units を用い、 37°C で1時間反応させ完全分解した。このEcoRI分解DNAにクローニングベクターpHSG399 (宝酒造より市販) を制限酵素EcoRIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、 50mM トリス緩衝液 (pH7.6)、 10mM ジチオスレイトール、 1mM ATP 、 10mM MgCl_2 及び T_4DNA リガーゼ 1unit の各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、 4°C で15時間反応させ、結合させた。

【0052】(C) アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの選択

上記遺伝子の選抜に用いたアスパルトキナーゼ欠損大腸菌変異株は、エシェリヒア・コリCGSC 5074 (thr A1101、lys C1001、met L1000) である〔()内はアスパルトキナーゼ遺伝子型 (Genotype) を示す〕。上記(B)項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により前記エシェリヒア・コリCGSC 5074株を形質転換し、クロラムフェニコール 50mg を含む選択培地 [K_2HPO_4 7g、 KH_2PO_4 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1

g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗抹した。

【0053】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpHSG399の長さ2.2kbのDNA断片に加え、長さ約3.8kbの挿入DNA断片が認められた。

【0054】本プラスミドをpHSG399-AKと命名した。

【0055】(D) アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (A) 断片のサブクローニング
上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AKに含まれるDNA挿入断片を、必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpUC119 (宝酒造より市販) へアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0056】上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AKを制限酵素EcoRI、NruIで切断したものと、プラスミドpUC119を制限酵素EcoRI、SmaIで切断したものを混合し、 50mM トリス緩衝液 (pH7.6)、 10mM ジチオスレイトール、 1mM ATP 、 10mM MgCl_2 及び T_4DNA リガーゼ 1unit の各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、 12°C で15時間反応させ、結合させた。

【0057】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により前記エシェリヒア・コリCGSC 5074株を形質転換し、アンピシリン 50mg を含む選択培地 [K_2HPO_4 7g、 KH_2PO_4 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗抹した。

【0058】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpUC119の長さ3.2kbのDNA断片に加え、長さ約1.7kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約1.7kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0059】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表2に示す。

【0060】

【表2】

表2 プラスミドpUC119-AK

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamH I	1	4.9
Bgl II	2	4.2, 0.6
Hind III	2	3.6, 1.2

上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpUC119-AKと命名した。

【0061】 以上によりアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含む大きさが約1.7 kbのDNA断片 (EcoRI-BamHI断片) を得ることができた。

【0062】 実施例2

アスパルトキナーゼをコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例1の(D)項で得られたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含む長さが約1.7 kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119 (宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination 法) (Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977) により図2に示した戦略図に従って決定した。

【0063】 その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、アスパルトキナーゼをコードする遺伝子は、下記配列に示す塩基配列を有する421個のアミノ酸をコードする1263の塩基対より構成されていることが判明した。

【0064】

【化4】

実施例3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクターpCRY30の作成

(A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、ブレビバクテリウム・スタチオニスIFO12144 (FERM BP-2515) から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。半合成培地A培地 [尿素2 g、(NH₄)₂SO₄ 7 g、K₂HPO₄ 0.5 g、KH₂PO₄ 0.5 g、MgSO₄ 0.5 g、FeSO₄·7H₂O 6 mg、MnSO₄·4~6H₂O 6 mg、酵母エキス2.5 g、カザミノ酸5 g、ピチオン200 μg、塩酸チアミン200 μg、グルコース20 g及び蒸留水1 l] 1 lに、ブレビバクテリウム・スタチオニスIFO12144を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10 mg/mlの濃度にリゾチームを含む緩衝液 [25 mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、10 mMのEDTA、50 mMグルコース] 20 ml

1に懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液 [0.2 N NaOH、1% (W/V) SDS] 40 mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液 [5 M酢酸カリウム溶液60 ml、酢酸11.5 ml、蒸留水28.5 mlの混合液] 30 mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0065】 溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、上澄液を得た。

【0066】 これに等量のフェノール-クロロホルム液 (フェノール:クロロホルム=1:1混和液) を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000×gの遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0067】 沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液 [トリス10 mM、EDTA 1 mM; HClにてpH8.0に調整] 2 mlに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液 [5倍濃度のTE緩衝液100 mlに塩化セシウム170 gを溶解させた液] 15 mlと10 mg/mlエチジウムブロマイド溶液1 mlを加えて、密度を1.392 g/mlに合わせた。この溶液を12℃で42時間、116,000×gの遠心分離を行った。

【0068】 プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見いだされる。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。

【0069】 次にこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後にTE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3 M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30 mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20℃1時間静置した。この溶液を15,000×gの遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を50 μg得た。

【0070】 (B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298 (宝酒造製) 0.5 μgに制限酵素SalI (5 units) を37℃1時間反応させ、

プラスミドDNAを完全に分解した。

【0071】前記(A)項で調製したプラスミドpBY503の2 μ gに制限酵素XhoI(1unit)を37℃で30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7.6、10mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール、1mM ATP及びT4 DNAリガーゼ1unitになるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル(宝酒造製)を形質転換した。

【0072】形質転換株は30 μ g/ml(最終濃度)のカナマイシン、100 μ g/ml(最終濃度)のIPTG(イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド)100 μ g/ml(最終濃度)のX-gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド)を含むL培地(トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び蒸留水1l、pH7.2)で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法[T.Maniatis, E.F.Fritsch, J.Sambrook, "Molecular cloning"(1982) p90~91参照]により抽出した。

【0073】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4.0kbの断片が挿入されたプラスミドpHSG298-oriが得られた。

【0074】次に同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドpBY503DNAを制限酵素KpnI及びEcoRIにて処理して得られる約2.1kbのDNA断片を上記プラスミドpHSG298-oriのKpnI及びEcoRI部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

【0075】実施例4
プラスミドpCRY30-AKの作成及びコリネ型細菌への導入

実施例1の(C)項で得られたプラスミドpHSG39-AK 5 μ gを制限酵素EcoRI-NruIを各5units用い、37℃で1時間反応させ分解したものと、BamHIリンカー(宝酒造より市販)1 μ lを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。

【0076】このDNAを制限酵素BamHI 3unitsを用い37℃で1時間反応させ分解したものと、実施例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 1 μ gを制限酵素BamHI 1unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリCGSC5074株を形質転換し、カナマイシン50 μ g/mlを含む選択培地[K₂HPO₄ 7g、KH₂PO₄ 2g、(NH₄)₂SO₄ 1g、MgSO₄·7H₂O 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗抹した。

【0077】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ1.7kbの挿入DNA断片が認められた。

【0078】上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0079】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。

【0080】プレバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのバルス用溶液(272mM Sucrose、7mM KH₂PO₄、1mM MgCl₂; pH7.4)にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5mlのバルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50 μ lとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンパルサー(バイオラド社製)を用いて、2500ボルト、25 μ FDに設定し、パルスを印加後氷中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15 μ g/ml(最終濃度)を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3

(A)項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表3に示す。

【0081】

【表3】

表3 プラスミドpCRY30-AK

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
EcoRI	2	8.6, 1.7
BamHI	1	10.4

上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-AKと命名した。

【0082】なお、プラスミドpCRY30-AKにより形質転換されたプレビバクテリウム・フラバムMJ233-AKは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院微生物工業技術研究所に、平成3年12月16日付で：微工研菌寄第12658号（FERM P-12658）として寄託されている。

【0083】実施例5

プラスミドpCRY30-AKの安定性

前記のA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌処理したものに、実施例4で得た形質転換株プレビバクテリウム・フラバムMJ233-AKを植菌し、30℃にて24時間振盪培養を行った後、同様にして調製したA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌したものに、1ml当たり50cellsの割合になるように植菌し、同じく30℃にて24時間振盪培養を行った。次に遠心分離して集菌し、菌体を洗浄後、カナマイシンを15μg/mlの割合で添加したA培地及び無添加のA培地を用いて調製した平板培地に一定量塗抹し、30℃にて1日培養後生育コロニーをカウントした。

【0084】この結果、カナマイシン添加および無添加培地に生育したコロニーは同数であること、さらにA培地生育コロニーは全てカナマイシン添加培地に生育すること、すなわち該プラスミドの高度の安定性を確認した。

【0085】実施例6

レーリジンの生産

培地（尿素0.4%、硫酸アンモニウム1.4%、KH₂PO₄ 0.05%、K₂HPO₄ 0.05%、MgSO₄・7H₂O 0.05%、CaCl₂・2H₂O 2ppm、FeSO₄・7H₂O 2ppm、MnSO₄・4~6H₂O 2ppm、ZnSO₄・7H₂O 2ppm、NaCl 2ppm、ビオチン200μg/l、チアミン・HCl 100μg/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%）100mlを500ml容三角フラスコに分注、滅菌（滅菌後pH7.0）した後プレビバクテリウム・フラバム（*Brevibacterium flavum*）MJ233-AK（FERM P-12658号）を植菌し、無菌的にグルコースを5g/lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行った。

【0086】次に、本培養培地（グルコース5%、硫酸アンモニウム2.3%、KH₂PO₄ 0.05%、K₂HPO₄ 0.05%、MgSO₄・7H₂O 0.05%、FeSO₄・7H₂O 20ppm、MnSO₄・4~6H₂O 20ppm、ビオチン200μg/l、チアミン・HCl 100μg/l、カザミノ酸0.3%、酵母エキス0.3%）の1000mlを2l容通気攪拌槽に仕込み、滅菌（120℃、20分間）後、前記前培養物の20mlを添加して、回転数1000rpm、通気量1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間培養を行った。

【0087】培養終了後、培養物500mlから遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて2度洗浄した菌体を反応液〔(NH₄)₂SO₄ 2g/l；KH₂PO₄ 0.5g/l；KH₂PO₄ 0.5g/l；MgSO₄・7H₂O 0.5g/l；FeSO₄・7H₂O 20ppm；MnSO₄・4~6H₂O 20ppm；チアミン塩酸塩100μg/l；pH7.6〕の1000mlに懸濁後、該懸濁液を2l容通気攪拌槽に仕込み、グルコース9gを添加して、回転数300rpm、通気量0.1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間反応を行った。

【0088】反応終了後、遠心分離（4000rpm、15分間、4℃）にて除菌した上清液中のレーリジンを定量した。その結果、上清液中のレーリジン生成量は、1.5g/lであった。

【0089】この反応終了後の培養液500mlを、強酸性陽イオン交換樹脂（H⁺型）のカラムに通してレーリジンを吸着させ、水洗後、0.5Nアンモニア水で溶出させた後、レーリジン画分を濃縮し、冷エタノールでレーリジンの結晶を析出させた。その結果、400mgのレーリジン結晶を得た。

【0090】また、比較例として、同様の条件にて、プレビバクテリウム・フラバム（*Brevibacterium flavum*）MJ-233（FERM BP-1497）を培養し、同様の条件にて反応させた後上清液中のレーリジンを定量した。その結果、上清液中のレーリジン生成量は0.6g/lであった。

【0091】

【化5】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の制限酵素による切断点地図。

【図2】大きさが約1.7kbの本発明DNA断片の塩

基配列決定のための概略図。

【化2その1】

Val	Ala	Leu	Val	Val	Gln	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Ala
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ile	Arg	Asn	Val	Ala	Glu	Arg	Ile	Val	Ala	Thr	Lys	Lys	Ala
				20				25					30		
Gly	Asn	Asn	Val	Val	Val	Val	Cys	Ser	Ala	Met	Gly	Asp	Thr	Thr	Asp
				35			40					45			
Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Asn	Pro	Val	Pro	Pro	Ala	Arg
				50			55				60				
Glu	Met	Asp	Met	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu
65					70					75				80	
Val	Ala	Met	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Thr
					85					90				95	
Gly	Ser	Gln	Ala	Gly	Val	Leu	Thr	Thr	Glu	Arg	His	Gly	Asn	Ala	Arg
					100				105				110		
Ile	Val	Asp	Val	Thr	Pro	Gly	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Leu	Asp	Glu	Gly
				115			120					125			
Lys	Ile	Cys	Ile	Val	Ala	Gly	Phe	Gln	Gly	Val	Asn	Lys	Glu	Thr	Arg
				130			135					140			
Asp	Val	Thr	Thr	Leu	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Thr	Thr	Ala	Val	Ala
145					150					155				160	

【化2その2】

Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val

165

170

175

Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys

175

180

185

Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly

190

195

200

Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn

205

210

215

Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu

220

225

230

235

Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr

240

245

250

Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile

255

260

265

Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp

270

275

280

Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu

285

290

295

Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg

300

305

310

315

【化2その3】

[配列]

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG
Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
1 5 10 15
GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CCG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
20 25 30
GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT
Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
35 40 45
GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
50 55 60
GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
65 70 75 80
GTC GGC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
85 90 95
GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC

【化3その2】

Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
100 105 110
ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
115 120 125
AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
130 135 140
GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
145 150 155 160
TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
165 170 175
GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
175 180 185
CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC

【化3その3】

Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly

190

195

200

TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT

Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn

205

210

215

GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG

Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu

220

225

230

235

ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC

Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr

240

245

250

GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT

Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile

255

260

265

TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT

Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp

270

275

280

GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA

Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu

285

290

295

【化3その4】

GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC

Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg

300 305 310 315

CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC

Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr

320 325 330

AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG

Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala

335 340 345

GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG

Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu

350 355 360

CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TOC ACC TCT GAG ATC CGC

Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg

365 370 375

ATT TOC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA

Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala

380 385 390 400

CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GGC GTC GTT TAT

【化3その5】

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr

405 410 415

GCA GGC ACC GGA CGC

Ala Gly Thr Gly Arg

420

【化4その1】

[配列]

GTG	GCC	CTG	GTC	GTA	CAG	AAA	TAT	GGC	GGT	TCC	TCG	CTT	GAG	AGT	GCG
Val	Ala	Leu	Val	Val	Gln	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Ala
1				5					10					15	
GAA	CGC	ATT	AGA	AAC	GTC	GCT	GAA	CGG	ATC	GTT	GCC	ACC	AAG	AAG	GCT
Glu	Arg	Ile	Arg	Asn	Val	Ala	Glu	Arg	Ile	Val	Ala	Thr	Lys	Lys	Ala
				20					25					30	
GGA	AAT	AAT	GTC	GTG	GTT	GTC	TGC	TCC	GCA	ATG	GGA	GAC	ACC	ACG	GAT
Gly	Asn	Asn	Val	Val	Val	Val	Cys	Ser	Ala	Met	Gly	Asp	Thr	Thr	Asp
				35					40					45	
GAG	CTT	CTA	GAA	CTT	GCT	GCG	GCA	GTG	AAT	CCC	GTT	CCG	CCA	GCT	CGT
Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Asn	Pro	Val	Pro	Pro	Ala	Arg
				50					55					60	
GAA	ATG	GAT	ATG	CTC	CTG	ACT	GCT	GGT	GAG	CGT	ATT	TCT	AAC	GCT	CTC
Glu	Met	Asp	Met	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu
65					70				75					80	
GTC	GCC	ATG	GCT	ATT	GAG	TCC	CTG	GGT	GCA	GAG	GCT	CAA	TCT	TTC	ACG
Val	Ala	Met	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Thr
					85				90					95	
GGT	TCT	CAG	GCT	GGT	GTG	CTC	ACC	ACC	GAG	CGT	CAC	GGA	AAC	GCA	CGC

【化4その2】

Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg

100

105

110

ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC

Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly

115

120

125

AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC

Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg

130

135

140

GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA

Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala

145

150

155

160

TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT

Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val

165

170

175

GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG

Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys

175

180

185

CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC

Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly

190

195

200

【化4その3】

TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT

Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn

205

210

215

GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG

Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu

220

225

230

235

ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT OCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC

Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr

240

245

250

GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT

Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile

255

260

265

TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT

Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp

270

275

280

GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA

Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu

285

290

295

GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC OCT CGC TCT GAC GGA CGC

【化4その4】

Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg

300 305 310 315

CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC

Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr

320 325 330

AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG

Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala

335 340 345

GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG

Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu

350 355 360

CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC

Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg

365 370 375

ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA

Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala

380 385 390 400

CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr

405 410 415

【化4その5】

【化5その1】

GCA GGC ACC GGA CGC

Ala Gly Thr Gly Arg

420

配列番号：1

配列の長さ：1263

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレビバクテリウム フラバム

株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1263

特徴を決定した方法：P

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG

Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala

1 5 10 15

GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT

Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala

20 25 30

【化5その2】

GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT

Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp

35

40

45

GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT

Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg

50

55

60

GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC

Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu

65

70

75

80

GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG

Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr

85

90

95

GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC

Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg

100

105

110

ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC

Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly

115

120

125

AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC

【化5その3】

Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg

130

135

140

GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA

Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala

145

150

155

160

TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT

Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val

165

170

175

GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG

Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys

175

180

185

CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC

Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly

190

195

200

TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT

Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn

205

210

215

GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG

Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu

220

225

230

235

【化5その4】

ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 240 245 250
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 255 260 265
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 270 275 280
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 285 290 295
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 300 305 310 315
 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 320 325 330
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG

【化5その5】

Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala

335

340

345

GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG

Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu

350

355

360

CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC

Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg

365

370

375

ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA

Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala

380

385

390

400

CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr

405

410

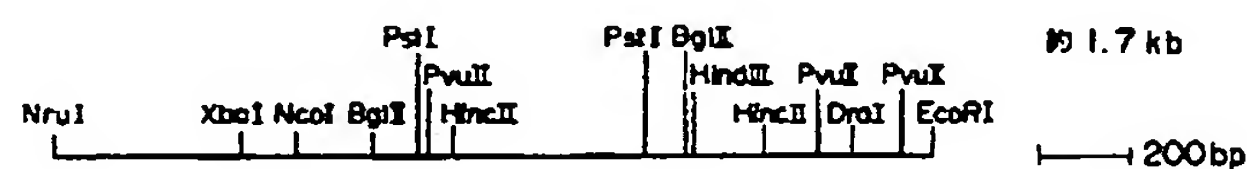
415

GCA GGC ACC GGA CGC

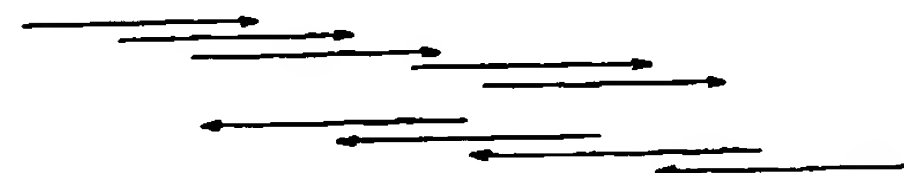
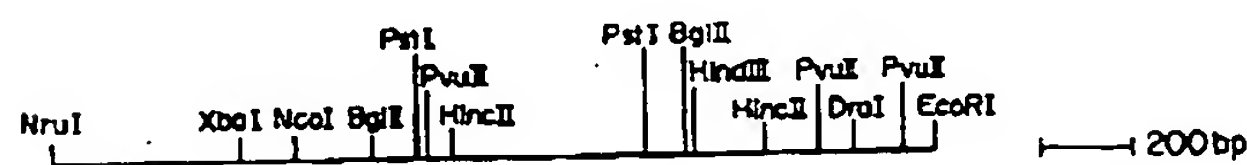
Ala Gly Thr Gly Arg

420

【图 1】



【图 2】



フロントページの続き

(72)発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央 8 丁目 3 番 1 号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.